



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Patentschrift**
(10) **DE 198 53 398 C 1**

(51) Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68
G 01 N 27/62

(21) Aktenzeichen: 198 53 398.5-41
(22) Anmeldetag: 19. 11. 1998
(43) Offenlegungstag: -
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 16. 3. 2000

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

(73) Patentinhaber:
Epigenomics GmbH, 10435 Berlin, DE

(74) Vertreter:
Schubert, K., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
10119 Berlin

(72) Erfinder:
Berlin, Kathrin, 14532 Stahnsdorf, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
DD 2 93 139 A5
US 58 24 471 A
WO 97 46 705 A1

- (54) Verfahren zur Identifikation von Cytosin-Methylierungsmustern in genomischer DNA
(57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Identifikation von 5-Methylcytosin-Positionen in genomischer DNA, welches dadurch gekennzeichnet ist, das folgende Verfahrensschritte ausgeführt werden:
a) die genomische DNA einer Zelle, einer Zelllinie, eines Gewebes oder eines Individuums wird chemisch so behandelt, daß Cytosin und 5-Methylcytosin unterschiedlich reagieren und sich in der Duplex ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten der beiden Produkte ergibt,
b) derselbe Nukleinsäure Abschnitt mittels einer Polymerasereaktion amplifiziert wird,
c) der gleiche Nukleinsäure Abschnitt mindestens einer weiteren Zelle, Zelllinie, Gewebe oder Individuum oder einer beliebigen Referenz-DNA entsprechend den Punkten a) und b) behandelt wird,
d) aus dem mindestens zwei Amplifikaten der Punkte b) und c) Heteroduplexes gebildet werden.
e) durch eine Reaktion, die spezifisch ist für nicht komplementäre Basenpaare, eine aufzeigbare Markierung in der Heteroduplex eingeführt wird.

Beschreibung

1. Kurzbeschreibung des Gebiets der Erfindung

Die genetische Information, die durch vollständige Sequenzierung genomischer DNA als Basenabfolge erhalten wird, beschreibt das Genom einer Zelle nur unvollständig. 5-Methylcytosin-Nucleobasen, die durch reversible Methylierung von DNA in der Zelle entstehen, sind ein epigenetischer Informationsträger und dienen beispielsweise zur Regulation von Promotoren. Der Methylierungszustand eines Genoms repräsentiert den gegenwärtigen Status der Genexpression, ähnlich wie ein mRNA Expressionsmuster. Gegenstand des vorliegenden Patentes ist ein Verfahren zur kostengünstigen und parallelisierbaren Auffindung von epigenetischen Informationsträgern in Form von 5-Methylcytosin-Basen in genomischer DNA.

2. Stand der Technik

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, genomischem Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Unglücklicherweise geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, die die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren, und es existiert kein Verfahren diese Information durch einen Amplifikationsschritt zu erhalten.

Es sind mehrere Verfahren bekannt, die diese Probleme lösen. Meist wird eine chemische Reaktion oder enzymatische Behandlung der genomischen DNA durchgeführt, infolge derer sich die Cytosin- von den Methylcytosin-Nucleobasen unterscheiden lassen. Eine gängige Methode ist die Umsetzung von genomischer DNA mit Disulfit (auch als Bisulfit oder Pyrosulfit bezeichnet), die nach alkalischer Hydrolyse in zwei Schritten zu einer Umwandlung der Cytosin Basen in Uracil führt (Shapiro, R., Cohen, B., Servis, R. Nature 227, 1047 (1970). 5-Methylcytosin bleibt unter diesen Bedingungen unverändert. Die 5-Methylcytosin bleibt unter diesen Bedingungen unverändert. Die Umwandlung von C in U führt zu einer Veränderung der Basensequenz, aus der sich durch Sequenzierung nun die ursprünglichen 5-Methylcytosine ermitteln lassen (nur diese liefern noch eine Bande in der C-Spur).

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, ist mitsamt der dazugehörigen Literatur dem folgenden Übersichtsartikel zu entnehmen: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 26, 2255 (1998).

In der DD 293 139 A5 wird ein Verfahren zur Charakterisierung bestimmter DNA-Sequenzen beschrieben, bei dem die DNA-Moleküle, deren nichtmethylierte Erkennungsstorte durch eine entsprechende Restriktionsendonuklease geschnitten werden sollen, im Reaktionsgemisch mit einer zweiten, unmethylierten DNA-Species (vor allem Oligonukleotid-Duplex, die den Erkennungsstort enthalten) inkubiert.

Die WO 97/46705 A1 offenbart ein Verfahren zum Nachweis einer methylierten, CpG enthaltenden Nukleinsäure, wobei man die Nukleinsäure enthaltende Probe mit einem Reagenz in Kontakt bringt, welches unmethyliertes Cytosin

ziert, wobei der Oligonukleotikprimer zwischen modifizierten methylierten und nichtmethylierten Nukleinsäuren unterscheidet und die methylierten Nukleinsäuren nachweist.

Ferner beschreibt US 5,824,471 A1 ein Verfahren zur Bestimmung von Abweichungen zwischen zwei Nukleinsäuresträngen, wobei eine Vielzahl von Duplexen aus den beiden Strängen oder deren Teile gebildet und diese Duplex mit einer ersten und einer zweiten unterschiedlichen Bakteriophagen Resolvase in Kontakt gebracht wird und wobei man dann feststellt, von welcher Bakteriophagen Resolvase die Duplex gespalten wird, wobei hierdurch die Unterschiede ermittelt werden.

Nicht immer jedoch ist es erforderlich, tatsächlich die gesamte Sequenz eines Gens oder Genabschnitts zu ermitteln, 15 wie dies bei einer Sequenzierung das Ziel ist. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn wenige 5-Methylcytosin-Positionen innerhalb einer längeren Basensequenz für eine Vielzahl von unterschiedlichen Proben abzutasten sind. Die Sequenzierung liefert hier in großem Umfang redundante Information und ist zudem sehr teuer. Dies ist auch schon dann der Fall, wenn die Sequenz bereits bekannt ist und ausschließlich Methylierungspositionen dargestellt werden sollen. Auch ist es denkbar, daß in einigen Fällen überhaupt nur die Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen verschiedenen genomischen DNA-Proben von Interesse sind und daß auf die Ermittlung einer Vielzahl übereinstimmender methylierter Positionen wie auch auf die Sequenzierung verzichtet werden kann. Für die hier angeführten Fragestellungen existiert bislang kein Verfahren, das ohne Sequenzierung jeder einzelnen Probe kostengünstig die gewünschten Ergebnisse liefert.

Sequenzinformation muß auch deshalb immer weniger neu ermittelt werden, weil die Genomprojekte, deren Ziel die vollständige Sequenz verschiedener Organismen ist, zügig voranschreiten. Vom menschlichen Genom sind zwar derzeit erst etwa 5% fertig sequenziert, jedoch kommen jetzt, weil andere Genomprojekte dem Ende zuneigen und dadurch Sequenzierressourcen frei werden, jedes Jahr weitere 5% dazu. Mit der Vervollständigung der Sequenzierung des menschlichen Genoms wird bis zum Jahre 2006 gerechnet.

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) ist eine neue, sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas, M. and Hillenkamp, F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301). Ein Analytmolekül wird in eine im UV absorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix ins Vakuum verdampft und der Analyt so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer umgerechnet. Derzeit ist diese Technologie in der Lage im Massenbereich von 1.000 bis 4.000 Da Moleküle mit einer Massendifferenz von 1 Da 50 zu unterscheiden. Durch die natürliche Verteilung von Isotopen sind die meisten Biomoleküle jedoch schon etwa 5 Da breit. Technisch ist diese massenspektrometrische Methode also vorzüglich für die Analyse von Biomolekülen geeignet. Vernünftigerweise müssen zu analysierende Produkte, die 55 unterschieden werden sollen, mindestens 5 Da auseinander liegen. In diesem Massenbereich könnten also 600 Moleküle unterschieden werden. Im Bereich zwischen 4.000 und 100.000 Da wird zwar nicht mehr Isotopenauflösung erzielt, jedoch ist dieser Bereich auch anwendbar. Kürzlich ist der Einsatz eines infrarot (IR) Lasers gekoppelt mit der MALDI Analyse von DNA beschrieben worden (Berkenkamp, S., 60

Durch diese Kombination wurde es möglich DNA Fragmente mit einer Größe von bis zu 2.500 Basen zu detektieren.

Chemical mismatch cleavage ist eine Methode mit welcher kleine Unterschiede zwischen zwei DNA Einzelsträngen aufgezeigt werden können (Cotton, R. G. H., Rodriguez, N. R. and Campbell, R. D. 1988. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 4397–4401; Cotton, R. G. H. 1993. Current methods for mutation detection. Mut. Res. 285: 125–144; Saleeba, J. A. and Cotton, R. G. H. 1993. Chemical cleavage of mismatch to detect mutations. Methods in Enzymology. 217: 286–295; Smooker, P. M. and Cotton, R. G. H. 1993. The use of chemical reagents in the detection of DNA mutations. Mutations Res. 288: 65–77). Die chemische Reaktivität von C und T gegenüber Osmiumtetroxid und von C gegenüber Hydroxylamin ist erhöht, wenn diese nicht mit ihren jeweiligen komplementären Basen gepaart sind. Durch die anschließende Behandlung mit Piperidin wird der Nukleinsäurestrang an der modifizierten Position gebrochen.

Eine weitere Möglichkeit nicht komplementäre Basenpaare in Heteroduplex DNA aufzuzeigen, besteht im Einsatz von Enzymen wie MutS, die an nicht komplementäre Basenpaare binden (Smith, J. und Modrich, P. 1996. Mutation detection with MutH, MutL and MutS mismatch repair proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4374–4379; Parsons, B. L. und Heflich, R. H. 1997. Evaluation of MutS as a tool for direct measurement of point mutations in genomic DNA. Mut. Res. 374: 277–285).

3. Aufgabenstellung

Derzeit fehlt ein schnelles, kostengünstiges und automatisierbares Verfahren zur Auffindung von methylierten Cytosinen in genomicscher DNA. Ein solches Verfahren ist aber von großem Interesse, da unterschiedliche Methylierungsmuster auf vielfältige Weise zur Charakterisierung von Zelltypen und damit zur Diagnose und Klassifizierung von Krankheiten (wie beispielsweise Tumoren) herangezogen werden können als auch zum Beispiel für Studien der Zell-differenzierung genutzt werden könnten.

4. Beschreibung

Das Verfahren dient zur Identifikation von 5-Methylcytosin-Positionen in genomicscher DNA, die unterschiedlichsten Ursprungs sein kann. Die genomicsche DNA wird zunächst chemisch so behandelt, daß sich ein Unterschied in der Reaktion der Cytosin-Basen zu den 5-Methylcytosin-Basen ergibt. Mögliche Reagenzien sind hier z. B. Disulfit (auch als Bisulfit oder Pyrosulfit bezeichnet), Hydrazin und Permanganat. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird die genomicsche DNA mit Disulfit in Gegenwart von Hydrochinon oder Hydrochinonderivaten behandelt, wobei selektiv nach anschließender alkalischer Hydrolyse die Cytosin-Basen in Uracil umgewandelt werden. 5-Methylcytosin bleibt unter diesen Bedingungen unverändert. Nach einem Aufreinigungsprozeß, der der Abtrennung des überschüssigen Disulfits dient, wird nun ein bestimmter Abschnitt der vorbehandelten genomicschen DNA in einer Polymerasereaktion amplifiziert. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird hier die Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Anschließend wird derselbe Abschnitt einer anderen genomicschen DNA-Probe gleichermaßen amplifiziert.

zugten Variante des Verfahrens erfolgt dies derart, daß einer der PCR-Primer eine zur Immobilisierung geeignete Funktion trägt und daß nur ein Strang aus dem Amplifikat der ersten Probe immobilisiert wird und anschließend eine Hybridisation mit dem Amplifikat der zweiten Probe erfolgt. In einer weiteren bevorzugten Variante wird eine Vielzahl unterschiedlicher Amplifikate desselben Nukleinsäure-Abschnittes auf diese Art und Weise gegen den immobilisierten Einzelstrang aus dem Amplifikat der ersten Probe hybridisiert, welches auf viele Wells einer Mikrotiterplatte verteilt wurde. In jedem Well kann nun ein Hybridisationsexperiment durchgeführt werden.

Nach der Hybridisation wird ein Verfahren durchgeführt, das an den Positionen, in denen eine Basenfehlpaarung in der Heteroduplex auftritt, eine nachweisbare Markierung hinterläßt. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird dies durch Chemical Mismatch Cleavage durchgeführt, das an den Positionen, an denen eine Basenfehlpaarung auftritt, zu einem Rückgratbruch führt. Die dadurch erhaltenen Fragmente lassen sich durch ein beliebiges Verfahren, das die Größe von DNA-Fragmenten aufzeigen kann, analysieren. Ein solches Verfahren sollte idealerweise Rückschlüsse auf jede Position in dem amplifizierten Nukleinsäureabschnitt der Probe erlauben, an denen eine Basenfehlpaarung in der Heteroduplex auftrat. Basenfehlpaarungen in der Heteroduplex sind insbesondere dann vorhanden, wenn in der DNA aus einer Probe an dieser Position Cytosin vorhanden war, das in Uracil umgewandelt wurde, in der anderen jedoch 5-Methylcytosin, das bei der chemischen Vorbehandlung unverändert blieb. Das Verfahren kann sowohl für den Vergleich zweier oder mehrerer genomicscher DNA Proben genutzt werden, in diesem Fall liefert die Analyse der Fragmente nur die Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen den beiden Proben im jeweiligen amplifizierten Nukleinsäure Abschnitt. Es ist aber auch möglich, eine vollständig enzymatisch am C methylierte oder demethylierte DNA als Referenz einzusetzen. In diesem Fall liefert die Analyse der Fragmente alle 5-Methylcytosin-Positionen im jeweiligen amplifizierten Nukleinsäure Abschnitt.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird Massenspektrometrie für die Fragmentanalyse eingesetzt. Die Fragmente können nach vorheriger Aufreinigung im MALDI-Massenspektrometer analysiert werden. Alternativ können die Lösungen mit Electrospray Ionisations Massenspektrometrie (ESI) analysiert werden. Je nach Leistungsfähigkeit der Methode und des eingesetzten Instruments kann es erforderlich sein, den betreffenden Nukleinsäureabschnitt in mehreren Teilschritten zu untersuchen, indem in mehreren PCRs ein Primer schrittweise neu positioniert wird und sich damit unterschiedliche Teilamplifikate ergeben ("Primer Walking").

In einer Variante des Verfahrens können die Basenfehlpaarungen – alternativ zur Analyse von Fragmenten nach einer Rückgratspaltung in der Heteroduplex – auch durch ein Enzym nachgewiesen werden, das mit einem nicht komplementären Basenpaar einen Komplex bildet. In einer bevorzugten Variante ist dieses Enzym MutS, das eine Markierung, z. B. eine Fluoreszenz-, Chemiluminiszenz- oder Massenmarkierung, trägt.

In einer weiteren Variante des Verfahrens wird das Vorhandensein von Basenfehlpaarung, das heißt in diesem Fall auch von relevanter Information in dem amplifizierten Nukleinsäure Abschnitt, durch eine Fluoreszenz- oder Chemiluminiszenzmarkierung nachgewiesen. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird ein immobilisierter DNA Strang aus dem Amplifikat der Probe 1 an dem nicht zur Im-

Heteroduplexes gebildet, die einem Chemical Mismatch Cleavage unterworfen werden. Findet eine Rückgratspalzung am immobilisierten Strang statt, so verschwindet nach einem denaturierenden Waschschritt die Fluoreszenzmarkierung, wird der Strang nicht gespalten, so bleibt die Markierung erhalten. Nur die Amplifikate, die gespalten wurden, werden nachfolgend massenspektrometrisch näher untersucht.

5. Beispiele

5.1. Verfahren zur Auffindung aller methylierten Cytosin-Positionen

Die zu untersuchende genomische DNA stammend aus einer Zelllinie oder möglichst nur einer Zelle wird auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt und die eine Hälfte enzymatisch entweder vollständig am Cytosin methyliert oder demethyliert. Das Enzym wird thermisch inaktiviert und anschließend werden beide Teile wieder zusammengegeben und mit Disulfit und nachfolgend Alkali behandelt. Nach einer Aufreinigung wird mittels PCR amplifiziert.

Das nun durchgeführte chemical mismatch cleavage, das für C Mismatches spezifisch ist, führt zu einer Spaltung an den Positionen einer jeweiligen Heteroduplex, an denen ein ursprünglich methyliertes C vorgelegen hat, falls einer vollständigen Demethylierung der einen Hälfte der genomischen Probe durchgeführt wurde. Umgekehrt erfolgt eine Spaltung an allen ursprünglich nicht methylierten Positionen, falls eine vollständige Methylierung der einen Hälfte der genomischen Probe zuvor durchgeführt wurde. Zur Sicherheit können auch sowohl Methylierung als auch Demethylierung als Referenz durchgeführt werden, in diesem Fall müssen diese jedoch in zwei PCRs getrennt eingesetzt werden.

Variante 1: Das obige Verfahren wird so durchgeführt, daß in der PCR ein Primer eingesetzt wird, der so funktionalisiert ist, daß nach der PCR eine einfache und spezifische Immobilisierung ermöglicht wird. Die Immobilisierung erfolgt an beads oder an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte. Dies erlaubt die einfache Abtrennung von Bestandteilen der Polymerase- und mismatch cleavage Reaktionen. Nach der chemical mismatch cleavage Reaktion wird die Duplex thermisch denaturiert und die Lösung abpipettiert. Die DNA-Fragmente werden aus dieser Lösung auf ein reversed phase Material aufgebracht und gereinigt.

Im Massenspektrometer ergeben die Fragmente eine "Leiter" von Peaks, die auf die methylierten Positionen schließen lässt. Es fallen aufgrund der symmetrischen Methylierung an CpG Positionen theoretisch immer zwei Peaks je CpG an, die jeweils vom sense und vom antisense-Strang stammen.

Variante 2: Die Reaktionen werden in Lösung durchgeführt und eine Aufreinigung nach den einzelnen Reaktionsschritten erfolgt, wenn notwendig, jeweils über ein reversed phase Material.

Variante 3: Mehrere Individuen oder Zelltypen werden parallel untersucht. Eine Referenz-DNA wird vollständig demethyliert und anschließend mit Disulfit behandelt. Sie wird nach Aufreinigung mittels PCR amplifiziert. Dabei wird wiederum ein Primer verwendet, der eine zur Immobilisierung geeignete Funktion trägt. Die Lösung wird auf die Wells einer Mikrotiterplatte verteilt und immobilisiert. Dann erfolgt eine Hybridisierung gegen die PCR-Produkte aus ebenfalls mit Disulfit behandelten Proben, jeweils eine je Well (siehe auch ausführliches Beispiel mit 97 Individuen).

gesamten PCR-Produktes auf Methylierungen erforderlich wäre, kann der Bereich von Interesse auch schrittweise abgetastet werden, indem mehrere PCRs durchgeführt werden und jeweils einer der Primer um den jeweiligen Meßbereich des Massenspektrometers näher an den anderen herangesetzt wird. Damit wird beispielsweise immer nur der Bereich erfaßt, der zwischen dem zu verschiebenden Primer der jeweiligen und der nächsten PCR liegt. Das Verfahren ist mit den anderen Varianten kombinierbar.

5.2. Verfahren zur Auffindung von Positionen mit variabler Cytosin-Methylierung

DNA verschiedener Individuen oder Zelllinien wird gepoolt und wie oben beschrieben eine Behandlung mit Disulfit durchgeführt. Nach alkalischer Hydrolyse der Bisulfat-Addukte und Aufreinigung der Produkt-DNA wird diese mittels PCR amplifiziert. Anschließend wird erneut aufgereinigt und das PCR-Produkt nach einigen Minuten Reannealing bei 25°C mit OsO₄ an den Positionen mit einem C Mismatch gespalten (chemical mismatch cleavage). Ein Mismatch C gegen A tritt immer dann auf, wenn vor der Bisulfat-Behandlung nur in einigen Individuen dort ein methyliertes Cytosin vorhanden war. Gleichsam werden bei diesem Prozeß auch etwaige SNPs (single nucleotide polymorphisms) zur Spaltung der DNA führen. Diese müssen von den aufzufindenden Methylierungspositionen unterschieden werden, was durch das oben beschriebene Verfahren zur Auffindung aller methylierten Cytosine gewährleistet ist.

Die Produkt DNA wird nun massenspektrometrisch wie oben beschrieben untersucht. Wenn das anfangs generierte PCR-Produkt eine größere Länge aufweist als mit der zur Verfügung stehenden Technologie seitens der Massenspektrometrie nachzuweisen ist, so ist es möglich, daß die durch das chemical mismatch cleavage produzierten Fragmente nicht nachweisbar sind. Um dies zu umgehen, können mehrere PCRs iterativ durchgeführt werden, das heißt das ein Primer immer konstant gehalten wird, während der andere Primer immer in mehreren Schritten jeweils um die Nachweisgrenze des Massenspektrometers näher an dem anderen Primer positioniert wird (Primer walking).

5.3. Verfahren mit 97 Individuen

45 Ein genomicscher Abschnitt eines Individuums (Referenzindividuum) wird mit Disulfit behandelt und damit die Cytosine nach anschließender alkalischer Hydrolyse des Bisulfitadduktes in Uracile umgewandelt. Die Methylcytosine bleiben bei dieser Reaktionsfolge unangetastet. Das Produkt

50 wird aufgereinigt und mittels PCR amplifiziert. Einer der PCR-Primer ist am 5'Ende mit einer chemischen Modifikation versehen, die zur Immobilisierung dient. Das Produkt dieser PCR wird in die 96 Kammern einer Mikrotiterplatte gegeben und die Bindung der PCR Produkte mit der Oberfläche induziert. Da nur ein Primer mit der chemischen Modifikation für die Bindung versehen ist, bindet nur ein DNA Strang an die Oberfläche. Die Platte wird gewaschen um Reagenzien der Bindungsschemie und die komplementären Stränge zu beseitigen. Somit ist die Platte mit dem Referenz-DNA-Stück vorbereitet. Der gleiche genomicsche Abschnitt wird in jedem der 96 anderen Individuen analog mit Disulfit behandelt und anschließend amplifiziert. Für diese PCR werden je zwei normale, unmodifizierte Primer der gleichen Sequenz wie für das Referenzindividuum verwendet.

65 Die 96 PCR Produkte werden in die 96 Wells der vorbereiteten Platte gegeben. Durch Aufheizen und langsames

teroduplex). Die 96 Individuen und Reagenzien vorheriger Reaktionen zu beseitigen. Eine OsO₄-Lösung wird in jedes der 96 Wells zugegeben, inkubiert und anschließend mit Piperidin ein Rückgratbruch in einer Heteroduplex mit einem nicht komplementären Basenpaar, von der eine Base C ist, induziert. Dies ist immer dann der Fall, wenn nur in einem Strang der Heteroduplex, das heißt in einem der Individuen, ein Methylcytosin anstelle eines Cytosins vorgelegen hat. In diesem Fall wurde nur das Cytosin des einen Individuums vor der PCR in ein Uracil überführt, wodurch sich in der Heteroduplex mit dem Gegenstrang eines anderen Individuums ein Mismatch ergibt. Der Assay ergibt also nicht direkt alle methylierten Cytosine eines genomischen Abschnittes, sondern nur diejenigen, die zwischen unterschiedlichen Individuen, Geweben, Zelllinien oder einzelnen Zellen variabel sind. Die Heteroduplex wird durch Aufheizen aufgeschmolzen und die Lösung in ein Massenspektrometer überführt.

5.4. Überführen der Lösung ins Massenspektrometer

Eine gute Variante ist die Lösung nach dem Schmelzen der Heteroduplex in eine Pipettenspitze aufzunehmen, die mit einem reversed phase Material bestückt ist. Die DNA Produkte binden daran, indem sie hydrophobe Wechselwirkungen über ihre Trialkylammonium-Gegenionen ausbilden und können so in mehreren Waschschritten von Reagenzien der chemical mismatch cleavage gereinigt werden. Mit 30% Acetonitril können die DNA Produkte wieder vom reverse-phase Material gelöst werden. Es bietet sich dabei an, die Produkte direkt auf eine vorbereitete Matrix auf einem MALDI Target zu geben. Nach dem Eintrocknen wird das Target ins Massenspektrometer eingeführt und die Produkte analysiert.

5.5. Vorselektion mittels Fluoreszenzmarkierung von für die Methylierungsdetektion relevanten Genabschnitten

Die zu untersuchende genomische DNA wird nach der wie oben beschriebenen Bisulfit Reaktion mit nachfolgender PCR Amplifikation, bei der wiederum einer der Primer eine zur nachfolgenden Immobilisierung dienliche Funktion trägt, an Beads oder einer entsprechend beschichteten Mikrotiterplatte immobilisiert. Vollständig demethylierte DNA, wie die Proben-DNA behandelt, wird als Referenz DNA verwendet und bildet mit der immobilisierten Proben-DNA eine Heteroduplex. Dann wird enzymatisch, beispielsweise mit terminal transferase, an die 3'-Enden des Produktes eine einzelne fluoreszenzmarkierte Base angehängt. Die nachfolgend durchgeführte "Chemical Mismatch Cleavage" Reaktion führt in dem Fall, das sich ein C/A Mismatch in dem Produkt befindet, zu einer Spaltung des immobilisierten Stranges, so daß nach der thermischen Dehybridisierung alle Fluoreszenzmarkierungen im nachfolgenden Waschschritt entfernt werden. War also eine Methylierung innerhalb des Amplifikates vorhanden, so tritt keine Fluoreszenz in der Mikrotiterplatte oder am bead mehr auf. Diese bleibt nur dann erhalten, wenn kein Mismatch vorliegt und damit keine 5-Methylcytosine im fraglichen Genabschnitt vorhanden sind. Bei dem Verfahren ist zu berücksichtigen, daß z. B. SNPs ein falsch positives Signal ergeben können.

Sinngemäß kann dieses Verfahren auch zur einfachen, fluoreszenzbasierten Detektion von 5-Methylcytosinen in kleinen Genabschnitten, z. B. Promotoren genutzt werden. Es kann aber nur die Aussage getroffen werden, ob in der fraglichen Region Methylierungen vorliegen oder nicht, nicht aber wieviele und an welchen Positionen. Dem steht

Bei den als relevant klassifizierten Genabschnitten kann dann analog einem der oben angeführten Beispiele die genaue Position den Methylcytosine durch Massenspektrometrie ermittelt werden.

5.6. Vorselektion von Heteroduplexes mit Mismatches

Die in einer Mikrotiterplatte immobilisierten Heteroduplexes werden zunächst mit einer Lösung von MutS, an welches ein fluoreszenter Farbstoff gebunden ist, zusammengebracht. Nur die Gefäße, in denen sich MutS an Basenfehlpaarungspositionen angelagert hat, was sich dadurch zeigt, daß nach mehreren Waschschritten immer noch die Fluoreszenz detektierbar ist, werden nachfolgend dem chemical mismatch cleavage unterworfen und im Massenspektrometer analysiert. Dadurch wird Zeit im Massenspektrometer und die Kosten für die Aufreinigung gespart, indem die Analyse von Proben ohne nachweisbare epigenetische Information vermieden wird.

20

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifikation von 5-Methylcytosin-Positionen in genomischer DNA dadurch gekennzeichnet, daß folgende Verfahrensschritte ausgeführt werden:

- a) die genomische DNA einer Zelle, einer Zelllinie, eines Gewebes oder eines Individuums wird chemisch so behandelt, daß Cytosin und 5-Methylcytosin unterschiedlich reagieren und sich in der Duplex ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten der beiden Produkte ergibt,
- b) derselbe Nukleinsäure Abschnitt mittels einer Polymerasereaktion amplifiziert wird,
- c) der gleiche Nukleinsäure Abschnitt mindestens einer weiteren Zelle, Zelllinie, Gewebe oder Individuum oder einer beliebigen Referenz-DNA entsprechend den Punkten a) und b) behandelt wird,
- d) aus den mindestens zwei Amplifikaten der Punkte b) und c) Heteroduplexes gebildet werden,
- e) durch eine Reaktion, die spezifisch ist für nicht komplementäre Basenpaare, eine aufzeigbare Markierung in die Heteroduplex eingeführt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Identifikation von Unterschieden im Cytosin-Methylierungsmuster zwischen verschiedenen Zellen, Zelllinien, Geweben und Individuen angewendet wird und nur Positionen aufzeigt, in denen die Cytosin-Methylierung zwischen unterschiedlichen Zellen, Zelllinien, Geweben oder Individuen variabel ist.

3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 2 dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt a) des Anspruchs 1. ein Disulfit (Bisulfit, Pyrosulfit) als Reagenz zur selektiven Umwandlung von Cytosin in Uracil eingesetzt wird, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß genomische DNA mehrerer Individuen, Gewebe, Zelllinien oder Zellen in Schritt b) des Anspruchs 1 gemeinsam amplifiziert werden.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß genomische DNA mehrerer Individuen, Gewebe, Zelllinien oder Zellen separat amplifiziert werden und anschließend gemeinsam nach Punkt e) des Anspruchs 1. behandelt werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, da-

25

30

35

40

45

50

55

60

- webe, Zelllinien oder Zellen an den Positionen Basenfehlpaarungen auftreten, an denen in der genomischen DNA ein 5-Methylcytosin lokalisiert war.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in Punkt d) durch Bildung von Heteroduplexes mit einer vollständig methylierten Referenz-DNA an den Positionen Basenfehlpaarungen auftreten, an denen sich in der genomischen DNA Cytosin befand. 5
 8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in Punkt d) durch Bildung von Heteroduplexes mit einer vollständig demethylierten Referenz-DNA an den Positionen Basenfehlpaarungen auftreten, an denen sich in der genomischen DNA 5-Methylcytosin befand. 10
 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Basenfehlpaarungen mittels "chemical mismatch cleavage" (chemische Veränderung an nicht komplementären Positionen) zu einer spezifischen oder hinreichend selektiven Rückgratsspaltung an diesen Positionen führen. 15
 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA an den Basenfehlpaarungen enzymatisch spezifisch oder hinreichend selektiv gespalten wird. 20
 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß in Punkt e) des Anspruchs 1. DNA-Fragmente erhalten werden, deren Größe einen Rückschluß auf die Spaltungspositionen und damit auf die Position der Methylcytosine und/oder die zwischen verschiedenen Individuen, Gewebe, Zelllinien oder Zellen veränderlichen Methylierungspositionen erlaubt. 25
 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Analyse der Größe (Molekulargewichte) der DNA-Fragmente mittels Massenspektrometrie durchgeführt wird. 30
 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Fragmente mittels Matrixassistierte Laser Desorptions/Ionisations Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI) analysiert werden. 35
 14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Fragmente mittels Electrospray Ionisations Massenspektrometrie (ESI) analysiert werden.
 15. Verfahren nach den Ansprüchen 13 und 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Größe der in Punkt e) des Anspruchs 1 erzeugten Fragmente der Leistungsfähigkeit des Massenspektrometers angepaßt wird. 40
 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere PCRs eines Genabschnittes ausgeführt werden und die Primer schrittweise so neu gesetzt werden, daß die zu erwartende Fragmentgröße jeweils mindestens in einer dieser PCRs in den mittels Massenspektrometrie nachweisbaren Massenbereich fällt. 45
 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß einer der PCR-Primer schrittweise um den maximal nachweisbaren Massenbereich des Massenspektrometers relativ zu dem anderen neu positioniert wird.
 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß in Verfahrensschritt b) ein Primer der PCR mit einer chemischen Funktion versehen wird, so daß sich das PCR Produkt an einer Oberfläche immobilisieren läßt. 60
 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das in Verfahrensschritt b)

- gefäß chemisch so geartet sind, daß das PCR Produkt daran gebunden werden kann.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß in Verfahrensschritt c) hergestellte PCR Produkte verschiedener Individuen in verschiedene nach Anspruch 19. zubereitete Reaktionsgefäß gegeben werden.
 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß für den Verfahrensschritt e) ein Enzym eingesetzt wird, welches mit einem nicht komplementären Basenpaar einen Komplex bildet.
 22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß dieses Enzym MutS ist.
 23. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Markierung trägt, durch welche ein Komplex veranschaulicht werden kann.
 24. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung eine Fluoreszenzmarkierung, eine Chemilumineszenzmarkierung, ein Massentag oder ein photochemisch abspaltbares Massentag ist.
 25. Verfahren nach den Ansprüchen 1–24, dadurch gekennzeichnet, daß eine amplifizierte DNA-Probe der Gruppe c) in Anspruch 1, welche einen Unterschied zu einer amplifizierten DNA-Probe der Gruppe b) in Anspruch 1 aufzeigt, in einer zweiten Runde des Verfahrens selbst einer DNA-Probe der Gruppe b) in Anspruch 1 wird und mit allen anderen zu untersuchenden DNA-Proben verglichen wird.
 26. Verfahren nach den Ansprüchen 1–25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Vorselektion der massenspektrometrisch im Detail zu untersuchenden Genabschnitte über eine Fluoreszenzmarkierung oder Chemiluminzenzmarkierung des immobilisierten DNA-Stranges erfolgt, deren Fehlen nach Durchführung der Schritte d) und e) des Anspruchs 1 und eines Waschschritts das Vorhandensein von methylierten Cytosinen im untersuchten genomischen DNA-Abschnitt anzeigen.
 27. Verfahren nach den Ansprüchen 1–25, dadurch gekennzeichnet, daß eine Vorselektion der massenspektrometrisch im Detail zu untersuchenden Genabschnitte über eine unspezifischere Variante entsprechend den Ansprüchen 20 bis 23 erfolgt.
 28. Kit für das Verfahren nach den Ansprüchen 1–26, bestehend aus der DNA von mindestens zwei möglichst verschiedenen Individuen, Geweben, Zelllinien oder Zellen sowie Reagenzien um die variablen Methylierungspositionen aufzuzeigen.
 29. Kit für das Verfahren nach den Ansprüchen 1–26, bestehend aus vollständig methylierter und/oder demethylierter DNA und Reagenzien, die zum Nachweis von methylierten Cytosinen in einer beliebigen DNA-Probe erforderlich sind.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.